



10978 U.S. PRO
10/076631
02/19/02

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 101 08 100.6

Anmeldetag: 20. Februar 2001

Anmelder/Inhaber: Aventis Pharma Deutschland GmbH,
Frankfurt am Main/DE

Bezeichnung: Verwendung supersekretierbarer Peptide in Verfahren
zu deren Herstellung und paralleler Verbesserung der
Exportate eines oder mehrerer anderer Polypeptide
von Interesse

IPC: C 12 N 15/81

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 19. September 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Nietiedt

Verwendung supersekretierbarer Peptide in Verfahren zu deren Herstellung und paralleler Verbesserung der Exportate eines oder mehrerer anderer Polypeptide von Interesse

Verfahren zur Herstellung pharmazeutisch relevanter Proteine müssen unter dem Aspekt der Wirtschaftlichkeit zu biologisch aktiven möglichst reinen Produkten führen. Die Expression solch relevanter Proteine in Hefen findet dabei breite Anwendung. Die Herstellung von Proteinen wie Insulin, GM-CSF (Leukine®) und Hirudin (Refludan®) sind Beispiele für die erfolgreiche Entwicklung gentechnischer Verfahren, die die Synthese des jeweiligen Proteins oder Vorläufern davon in Hefe als Grundlage haben. Besonders Hirudine lassen sich allgemein durch Hefen mit guten Ausbeuten, die bei Verwendung von *Hansenula polymorpha* (Weydemann et al., Appl. Microbiol Biotechnol. 44: 377 –385, 1995) oder *Pichia pastoris* (Rosenfeld et. al., Protein Expr. Purif :4 , 476 –82, 1996) sich im Grammaßstab bewegen, direkt synthetisieren.

EP-A 0 324 712 beschreibt das Hirudinderivat (Refludan®), das N-terminal die Aminosäure Leucin trägt und dessen konstitutive Expression in dem *Saccharomyces cerevisiae* Stamm Y79. EP-A 0 347 781 beschreibt ein Miniproinsulin und beispielhaft dessen Expression in Bäckerhefe. Zur Herstellung von Refludan® und Insulin werden zwei voneinander getrennte Expressionen durchgeführt.

Es wurde nun gefunden, daß sich Hirudinderivate und Miniproinsulinderivate aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein gewinnen lassen, wenn man das Vorläuferprotein an eine Signal bzw. Leader – Sequenz, die von Hefen als Sekretionssignal erkannt wird, über ein basisches Dipeptid bevorzugt Lys- Arg fusioniert und zwischen dem N – terminal angeordneten Hirudinderivat und dem Miniproinsulinderivat ebenfalls eine Spaltstelle einführt, die von einer Endoprotease der Hefe erkannt wird. Bevorzugt ist auch hier ein di – basisches Peptid z. B. Lys – Arg. Nach Expression findet man im Überstand ein um Lys - Arg verlängertes Hirdinderivat und das mit der ersten Aminosäure einer Insulin- B-Kette beginnende

Miniproinsulinderivat. Überraschend wurde dabei gefunden, daß sich die Ausbeute an Miniproinsulin deutlich gegenüber der mit der direkten Signal – Miniproinsulin Expression erzielbaren Ausbeute verbessert, während die Ausbeute an dem Hirudinderivat nahezu gleich bleibt. Überraschend wirkt also Hirudin als eine Art „Enhancerpeptid“ bezüglich der Ausbeute an Miniproinsulin.

Als Enhancerprotein können allgemein solche Peptide wirken, die relativ klein sind und natürlich in kurzer Zeit in großen Mengen z.B. aus Drüsengewebe ausgeschieden werden. Solche Peptide zu denen z. B. Schlangengifte oder Eglin C oder TAP (Tick antikoagulant peptide) zu zählen sind, zeichnen sich durch extrem gute Exportkompatibilität aus. Solche Proteine sind auch Gegenstand der Erfindung.

Ein weiterer Vorteil kann sich ergeben, wenn das Hirudinderivat gegenüber dem in Arzneimittel bereits verwendeten Hirudin pharmazeutisch gleiche oder bessere Eigenschaften aufweist. Dann eröffnet sich die Möglichkeit, aus ein und derselben Fermentation zwei oder sogar mehrere Arzneimittel herzustellen. Als Folge wird weniger Fermentationsbetriebskapazität benötigt. Dies wirkt sich direkt positiv auf die Herstellkosten aus.

Die Herstellung von mehreren Produkten ist aber optional. Der Mengenbedarf an Refludan ist z.B. geringer als der für Insulin, so daß man auch zu Verfahren gelangt, bei denen einer der pharmazeutisch interessanten Stoffen verworfen wird.

Zur Verbesserung der Ausbeute kann wie in der Patentanmeldung EP-A 0 200 655 vorgeschlagen eine kurze Peptidsequenz über Lys- Arg dem Hirudinderivat N-terminal als Brückenglied zur Signal- bzw. Leadersequenz vorgeschaltet sein. Auch ist dem Fachmann klar, daß die Wahl der Signal- bzw. Leadersequenz einen direkten Einfluß auf die Ausbeute an Wertprotein hat. Die Auswahl einer solchen Sequenz ist Gegenstand weiterer Optimierungen. Auch hat die am 3'-Ende der Expressionskassette gelegene Sequenz über die Beeinflussung der mRNA-Stabilität direkten Einfluß auf die Ausbeute. Auch hierzu ist dem Fachmann klar, daß diese Sequenz auf das jeweils zu exprimierende Wertprotein maßgeschneidert werden kann. Dies gilt auch für die Wahl eines geeigneten Promotors. Dieser kann

induzierbar oder konstitutiv aktiv sein. Die Wahl des Vektorsystemes und des Wirtssystemes ist genauso bedeutsam für die Ausbeute. So können anstelle der beispielhaft verwendeten Bäckerhefe auch die Hefen *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha* oder *K. lactis* mit den jeweils auf die unterschiedliche Physiologie maßgeschneiderten Vektor bzw. Expressionskassetten eingesetzt werden.

Der Vorteil von Verfahren, die die Sekretion in das Medium erlauben, liegt auch in der leichteren proteinchemischen Aufarbeitung des Wertproteins. Überraschend wurde dabei gefunden, daß Miniproinsulin durch Filtration durch Membranen mit einer Ausschlußgrenze von Molekülen mit einem Molekulargewicht größer 10 Kd in Gegenwart von Hirudin angereichert werden kann. Die Moleküle werden dabei fast ausschließlich im Retentat gefunden. Es ist dem Fachmann klar, daß Verfahren zur Reinigung stets durch die Entwicklung neuer Trennmethode und durch neue Kombination von Verfahrensschritten verbessert werden können. Dies wirkt sich direkt positiv auf die Ausbeute und damit auf die Herstellkosten aus.

Gegenstand der Erfindung ist also eine Expressionskassette der Form :

$P_x-S_x-B_n-(Z_R)\text{-Transportpeptid}-(Z_1Z_2)\text{-Protein}(Y)\text{-(}Z_1Z_2\text{)Protein}(Y_m)\text{-T}$;

wobei die Expressionskassette dadurch gekennzeichnet ist, daß sie für ein Transportpeptid kodiert, das über eine Sequenz Z_1Z_2 mit einem zweiten Protein verbunden ist, das wiederum über Z_1Z_2 mit einem Protein Y_1 , das entweder Y entspricht oder von Y verschieden sein kann verbunden ist und das Transportpeptid die Sekretionsrate von Y bzw. Y_m verbessert. Dabei gilt :

P_x entspricht einer beliebigen Promotor – DNA – Sequenz, die so ausgewählt wird, das optimale Ausbeuten an Wertprotein erzielbar werden;

S_x entspricht einer beliebigen DNA die entsprechend eine beliebige Signal bzw. Leadersequenz, die optimale Ausbeuten erlaubt, kodiert;

B_n entspricht 1-15 genetisch kodierten Aminosäuren oder einer chemischen Bindung;

Z entspricht dem Codon einer Aminosäure ausgewählt aus Lys bzw. Arg;

Z_1 entspricht dem Codon einer Aminosäure ausgewählt aus Lys bzw. Arg;

Z_2 entspricht dem Codon einer Aminosäure ausgewählt aus Lys bzw. Arg;

R entspricht einem Codon für Arg;

Transportpeptid entspricht einer DNA – Sequenz , die ein effizient transprotierbares und membrangängiges Peptid kodiert wie z.B Hirudin oder ein Derivat des Hirudin; Protein Y entspricht einer DNA – Sequenz , die ein beliebiges in Hefe herstellbares und sekretierbares Protein kodiert;

- 5 Protein Y_m entspricht einer DNA – Sequenz , die ein beliebiges in Hefe hestellbares und sekretierbares Protein kodiert ($m = 1- 5$) bzw. eine chemischen Bindung ($m = 0$) entspricht;

T entspricht einer nicht translatierten DNA – Sequenz, die sich vorteilhaft auf die Expression auswirkt.

10

Bevorzugt als Protein Y sind Polypeptide wie Proinsulinderivate, Interleukine oder Lymphokine bzw. Interferone.

Blutegel vom Typ *Hirudo* entwickelten z.B. verschiedene Isoformen des

- 15 Thrombininhibitors Hirudin. Durch künstliche Variation des Moleküls, z.B. Austausch der N-terminalen Aminosäure, wurde Hirudin für pharmazeutisch technische Anforderungen optimiert (z.B. EP 0 324 712). Die Erfindung beinhaltet die Verwendung von Hirudin und Hirudinvarianten. In besonderen Ausführungsformen der Erfindung wird eine der natürlichen Isoformen des Hirudins (die natürlichen
- 20 Isoformen werden zusammen als „Hirudin“ bezeichnet) verwendet. Eine natürliche Isoform ist z.B. Val-Val-Hirudin oder Ile-Thr – Hirudin . In anderen Ausführungsformen der Erfindung wird eine Variante einer natürlichen Hirudin Isoform eingesetzt. Eine Variante leitet sich von einer natürlichen Isoform des Hirudins ab, enthält aber z.B. zusätzliche Aminosäuren und/oder
- 25 Aminosäuredeletionen und/oder Aminosäureaustausche im Vergleich zu der natürlichen Isoform. Eine Variante von Hirudin kann alternierend Peptidabschnitte natürlicher Isoformen des Hirudins und neue Aminosäuren enthalten. Varianten des Hirudins sind bekannt und z.B. in DE 3 430 556 beschrieben. Varianten des Hirudins sind als Protein kommerziell erhältlich (Firma Calbiochem Biochemicals (Cat.no.377-
- 30 853, 950-960). Als Hirudinderivat werden Sequenzen bezeichnet die mindestens 40% Homologie zu natürlichem Hirudin aufweisen.

Die Expressionskassette wird vorzugsweise in Hefen wie *S. cerevisiae*, *K. lactis*, *H. polymorpha* oder *P. pastoris* eingeführt. Dabei kann sie stabil in einer oder mehreren

Kopien in das jeweilige Hefegenom integriert sein oder extrachromosomal auf einem „Multi-copy vector“ vorliegen. Es ist dem Fachmann klar, daß sich dies auch auf andere Systeme wie animale Zellkultur oder Pflanzenzellen übertragen läßt. Dies ist auch Gegenstand der Erfindung.

5

Das im folgenden beschriebene Expressionssystem dient dafür als Beispiel. Es ist dem Fachmann klar, daß, um die Expressionskassette in dieses ausgewählte System einzuführen, je nach Art des ausgewählten Wirtssystems die entsprechenden Konstruktionen rekombinanter DNA vorzunehmen sind.

10 Entsprechend kann die großtechnische Fermentation im Hinblick auf das ausgewählte Wirts / Vektorsystem optimiert werden. Demgemäß wirken die Beispiele nicht beschränkend.

Beispiel 1: Konstruktion eines Hefeexpressionsplasmides das Hirudin (Refludan)-
15 LyArg- Miniproinsulin kodiert

Ausgangsmaterialien sind die Plasmide pK152 (PCT/EP00/08537), pSW3 (EP-A 0 347 781) und das Derivat des rekombinanten Hefeplasmides , das für Rinderinterleukin 2 kodiert (Price et al., Gene 55, 1987). Das Hefeplasmid zeichnet
20 sich dadurch aus, daß es die α - Faktor Leader Sequenz unter Kontrolle des Hefe – ADH2 – Promotors steht. Angeschlossen über eine KpnI –

Restriktionsenzymerkennungsstelle findet sich die cDNA – Sequenz für Rinderinterleukin 2, die im nicht translatierten 3' - Ende nach Manipulation eine für den Vektor singuläre Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym NcoI enthält.

25 Somit kann die cDNA Sequenz über KpnI / NcoI – Spaltung leicht aus dem Plasmid entfernt werden. Da gute Expressionsausbeuten beschrieben werden , kann man davon ausgehen , daß die verbleibende 3'-Interleukin 2 Sequenz stabilisierend (als T) auf die mRNA wirkt und somit nicht ausgetauscht werden muß. Das Plasmid pK152 trägt die DNA Sequenz, die für Leu – Hirudin (Refludan) kodiert und das
30 Plasmid pSW3 trägt die DNA – Sequenz für Miniproinsulin. Die Gensequenz, die Hirudin – Lys Arg –Miniproinsulin kodieren soll, wird zunächst mittels PCR – Technologie hergestellt. Dazu werden 4 Primer mit Hilfe des Expedite™ DNA – Synthese - Systems hergestellt :

i. hir_insfkr (SEQ ID NO: 1, kodierter Proteinabschnitt: SEQ ID NO: 2)

I P E E Y L Q K R F V N Q H L C

5 5' - ATCCCTGAGGAATACCTTCAGAAGCGATTTGTTAACCAACACTTGTGTGG-3'

59 60 61 62 63 64 65 B1 B2 B3 B4 B5 B6 B7

ii. hir_insrevkr (SEQ ID NO: 3)

10 5' - CCTCACAAGTG TTGGTTAACA AATCGCTTCT GAAGGTATTC CTCAGGGAT-3'

iii. hirf1 (SEQ ID NO: 4, kodierter Proteinabschnitt: SEQ ID NO: 5)

L T Y T D C

5' - TTTTTTTGGATCCTTTGGATAAAAGACTTACGTATACTGACTGCAC

15

iv. insnco1rev (SEQ ID NO: 6)

5' - TTTTTTCCAT GGGTCGACTATCAG

20

Primer hir_insfkr beschreibt den Übergang der Codone für die letzten Aminosäuren des Hirudin (59 – 65) über das Brückenglied Lys – Arg zu der Inulinsequenz B1 – B7. Primer hir_insrevkr ist dazu 100% komplementär. Primer hirf1 kodiert für den Anfang des Hirudingens verlängert bis zu der KpnI – Schnittstelle wie in EP-A 0 324 712 beschrieben. Primer insncoirev markiert das 3' - Ende des synthetischen Mini-Proinsulins gemäß EP-A 0 347 781. Zwei Standard Polymerase Kettenreaktionen werden mit den Primerpaaren hirf1/ hir_insrevkr mit DNA des Plasmides pK152 als Matrize und hir_insfkr/ insncoirev mit DNA des Plasmides pSW3 als Matrize durchgeführt. Die Reaktionen werden in 100µl PCR – Puffer mit jeweils 200nMol Primer und 1µl Polymerase und 100ng Vektor durchgeführt. Schritt 1 besteht aus einer 2 - minütigen Inkubation bei 95°C. Dann folgen 25 Zyklen der Form 30'' bei 95 °C, 30'' bei 55 °C und 30'' bei 72 °C. Nach dem letzten Zyklus wird 3 Minuten bei 72 °C inkubiert und anschließend die Reaktion gestoppt.

30

Da die Primer hir_insrevkr und hir_insfr zu 100% komplementär sind, überlappen die DNA – Produkte der beiden Produkte entsprechend dieser Sequenz, so daß in einer dritten Reaktion mit den Produkten aus den beiden ersten Reaktionen als Matrize und den Primer hirf1 und insncoirev ein DNA – Fragment bildet, das Hirudin und Miniproinsulin getrennt durch LysArg kodiert. Das PCR – Fragment wird mit den Enzymen KpnI und NcoI verdaut und anschließend in den Kpn1 / NcoI geöffneten Vektor p α ADH2 in einer T4 – Ligasereaktion eingesetzt. In Analogie zu Beispiel 7 aus EP-A 0 347 781 werden anschließend kompetente Zellen des E. coli Stammes MM294 mit dem Ligationsgemisch transformiert. Zur Charakterisierung mittels DNA – Sequenzanalyse wird anschließend aus zwei Klonen Plasmid – DNA isoliert. Nach Bestätigung der insertierten DNA – Sequenz wird DNA einer Plasmidpräparation dazu verwendet entsprechend dem genannten Beispiel, Zellen des Bäckerhefestammes Y79 zu transformiert. Zum Unterschied wird aber bei Verwendung des p α ADH2 Vektors auf Komplementation der trp1-1 Mutation nach Einführung des Vektors selektioniert. Zur erneuten Kontrolle wird aus Hefetransformanten Plasmid DNA reisoliert und mittels Restriktionsanalyse analysiert. Der konstruierte Expressionsvektor erhält die Bezeichnung pADH2Hir_KR_Ins. Die Expression erfolgt gemäß Beispiel 4.

Beispiel 2: Konstruktion eines Hefeexpressionsplasmides das Hirudin (Refludan)-LysArg- Insulin - B Kette-LysArg – Insulin A- Kette kodiert

In der Patentanmeldungsschrift EP-A 0 195 691 werden Proinsulinderivate beschrieben, die als Bindeglied zwischen B und A- Kette des Insulins das Di- Peptid XY, mit X oder Y entspricht jeweils Lys oder Arg tragen können. Das folgende Beispiel beschreibt die Herstellung eines Expressionsvektors für solche Proinsulinderivate. Beispielhaft ausgewählt und entsprechend synthetisiert wird eine DNA – Sequenz, die für ein Proinsulinderivat der Form B – LysArg – A – Kette kodiert.

Die Synthese des Genabschnittes erfolgt entsprechend Beispiel 1. Verwendet werden die Oligonukleotidsequenzen hirf1 und insncoirev. Neu synthetisiert werden die Oligonukleotide B_KR_Af1 und B_KR_Arev1.

B_KR_Af1 hat die Sequenz (SEQ ID NO: 7)

5

5' CTTCTACACTCCAAAGACGAAACGCGGTATCG-3'

und B_KR_Arev1 die Sequenz (SEQ ID NO: 8)

10

5' CAACATTGTTCAACGATACCGCGTTTCGTCTTT-3'

Der fett gedruckte Teil der beiden dargestellten Primer markiert die sich partiell überlappende Sequenz. Beide Primer paaren bis auf die unterstrichenen 6 Nukleotide exakt mit der Sequenz des Miniproinsulins aus EP-A 0 347 781. Der unterstrichene Teil entspricht den Kodonen für Lys und Arg. DNA des gemäß Beispiel 1 konstruierten Plasmides pADH2Hir_KR_Ins dient als Matrize für die PCR.

Wie in Beispiel 1 beschrieben werden zwei Polymerase Kettenreaktionen mit den Primerpaaren hirf1 / B_KR_Arev und insncoirev / B_KR_Af1 durchgeführt. Als Matrize dient jeweils DNA des in Beispiel 1 konstruierten Plasmides pADH2Hir_KR_Ins. Die Produkte beider Reaktionen dienen in einer dritten PCR mit dem Primerpaar hirf1 und insnco1 als Matrize. Das Reaktionsprodukt aus PCR 3 wird mit NcoI/ Sall gespalten und in den geöffneten Vektor p α ADH2 eingesetzt. Nach Sequenz - und Restriktionsanalyse erhält das richtige Plasmid die Bezeichnung pADHHirKR_B_KR_A.

Beispiel 3: Konstruktion eines Hefepasmides, das für Hirudin – LysArg – Affenproinsulin kodiert

30

Die Patentanmeldung EP-A 489 780 beschreibt ein Plasmid pINT90d, das cDNA des Affenproinsulins (Wetkam et al., Gene 19, p.179-183, 1982) enthält. DNA dieses Plasmides und DNA des Plasmides pK152 dienen als Matrize. Verwendet wird der in Beispiel 1 beschriebene Primer hirf1. Drei weitere Primer werden synthetisiert.

Primer insncorev bindet revers an die 3'Region des in pINT90d klonierten Insulingens. Er hat die Sequenz:

5 5'-TTTTTTCCATGGTCATGTTTGACAGCTTATCAT-3' (SEQ ID NO: 9)

Die unterstrichene Sequenz markiert die Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym NcoI.

10 Primer hir_insfkr hat die Sequenz :

5'-ATCCCTGAGG AATACCTTCA **GAAGCG**ATTT GTGAACCAGC ACCTGTGCGG C-3'
(SEQ ID NO: 10)

15 Die fettgedruckten Nukleotide beschreiben dabei das LysArg Bindeglied zwischen Hirudin und Proinsulin.

Zu Primer hir_inskr vollständig komplementär ist der Primer hir_insrevkr mit der Sequenz :

20

5' -GCCGCACAGG TGCTGGTTCA CAAAT**CGCTT** CTGAAGGTAT TCCTCAGGGA T-
3' (SEQ ID NO: 11)

Entsprechend Beispiel 1 werden zwei Polymerasekettenreaktionen durchgeführt.

25

Das Primerpaar hirf1 / hir_insrevkr wird mit DNA des Plasmides pK152 und das Primerpaar hir_insfkr / insncorev wird mit DNA des Plasmides pINT90d umgesetzt. Wie ins Beispiel 1 beschrieben dienen die Produkte beider Reaktionen in einer dritten PCR mit dem Primerpaar hirf1 / insncorev als Matrize. Das DNA – Produkt dieser Reaktion umfaßt die Sequenz für Hirudin_LysArg_Proinsulin. Es wird mit den Enzymen NcoI und KpnI nachgespalten und entsprechend Beispiel 1 in das Plasmid pαADH2 eingesetzt.

30

Beispiel 4: Expression der rekombinanten Produkte

Die Expression gliedert sich in zwei Phasen. Zunächst wird eine Vorkultur in Hefeminimalmedium angezogen. Das Medium hat pro 1L die Zusammensetzung :

5	6,7g	- Yeast Nitrogen Base (ohne Aminosäuren)
	5,0g	- Casamino acids (frei von Vitamin)
	0,008 %	- Adenin
	0,008%	- Uracil
	2%	- Glukose

10 Die Haupt – bzw. Expressionskultur wird mit einem Aliquot der Vorkultur beimpft.

Das Medium der Hauptkultur enthält pro Liter :

	10g	- Yeast Extract
15	20g	- Peptone
	0,008%	- Adenin
	0,008%	- Uracil
	4 %	- Glukose

20 Unter Verwendung der beschriebenen Medien wird die Expression im Schüttelkolben so durchgeführt, daß 0,3 ml einer Vorkultur, die über Nacht angezogen wurde, mit 80ml vorgewärmtes Medium verdünnt wird und ca. 24h unter starkem schütteln bei 30°C inkubiert wird. Je 1ml der so entstandenen Kultur wird dann nach Bestimmung der optischen Dichte zentrifugiert und der Überstand
25 nach Abtrennen der Zellen lyophilisiert und mittels SDS –PAGE analysiert. Zur Bestimmung des Gehaltes an biologisch aktivem Hirudin wird ein Trombinhemmtest durchgeführt.

Ein alternatives Fermentationsprotokoll sieht das Abtrennen der Zellen durch
30 Filtration oder vorsichtige Zentrifugation vor. Während aus dem Medium Wertprotein isoliert wird, werden die Zellen mit frischem vorgewärmten Medium der Hauptkultur , das als Kohlenstoffquelle Alkohol und maximal bis 0,5% Glukose enthält, versorgt und so die Fermentation kontinuierlich weitergeführt. Dieser Schritt kann bis zu 5 mal wiederholt werden.

Beispiel 5: Thrombinhemmtest

- 5 Die Bestimmung der Hirudinkonzentration wird entsprechend der Methode von Griebach et al. (Thrombosis Research 37, 347 –350 , 1985) durchgeführt. Dazu werden definierte Mengen eines Refludanstandards zur Erstellung einer Eichkurve in die Meßreihe mit einbezogen . Damit kann die Ausbeute direkt in mg /l angegeben werden.

10

Beispiel 6: Klonierung und Expression des Hirudin – Lys Arg -Miniproinsulin – Fusionsproteins im P. pastoris – System

- 15 Die Firma Invitrogen vertreibt kommerziell einen Klonierungs und Expressionskit zur Herstellung rekombinanter Proteine mit P.pastoris als Wirtssystem System. Dabei wird ein genaues Arbeits bzw. Technikprotokoll bzgl. der Herstellung und und anschließenden Expression eines P.pastoris Systems zur Produktion eines gewünschten rekombinanten Proteins geliefert, so daß, wenn man diesen
- 20 Protokollen folgt nur die Konstruktion des das gewünschte Protein kodierenden Expressionsvektors beschrieben werden muß. Verwendet wird der EasySelect™ Pichia Expression Kit (Catalog No . K1740-01).

- Bestandteil des Kits ist der Vektor pPICZαA. Öffnet man den Vektor mit den
- 25 Restriktionsenzymen XhoI und SacII, so kann man eine Protein von Interesse ähnlich Beispiel 1 an die alpha – Faktor Leader Sequenz anschließen und auf Sekretion in den Überstand testen. Zur Klonierung werden zwei Primer benötigt. Primer pichia_H_If1 (SEQ ID NO: 12) hat die Sequenz :

- 30 5' - TTTTTTCTCGAGAAAAGA CTTACGTATACTGAC – 3'
- XhoI Hir₁ Hir₂ usw.

Primer pichia_H_Irev2 (SEQ ID NO: 13) hat die Sequenz:

5' - TTTTGGCGCCGAATTCACCTATTAGTTACAGTAGTTTTCC - 3'
 SacII EcoRI A21

Als Matrize verwendet man DNA des Plasmides pADH2Hir_KR_Ins. Führt man eine
 5 Standard PCR mit beiden Primer aus, so erhält man ein DNA –Produkt, daß die
 Sequenz Hirudin- Lys ARG –Miniproinsulin verlängert um die XhoI bzw. SacII
 Integrationsstelle enthält. Spaltet man das DNA – Produkt entsprechend und
 isoliert das Fragment, so kann es in einer T4 – DNA Ligase Reaktion in die geöffnete
 Vektor – DNA eingesetzt werden. Abweichend vom Protokoll der Hersteller wird der
 10 in Beispiel1 beschriebene E.coli Stamm MM294 mit dem Ligationsgemisch
 transformiert und auf Zeocin – Selektionsplatten rekombinante Kolonien gesucht.
 Plasmid DNA wird von Klonen reisoliert und anschließend mittels Restriktions – und
 DNA – Sequenzanalyse charakterisiert. Entsprechend der Angaben der Hersteller
 wird dann unter Verwendung des so konstruierten Plasmides ein P.pastoris
 15 Expressionsklon zur Produktion der Peptide hergestellt.

Beispiel 7: Reinigung von Miniproinsulin und Hirudin

20 Die Reinigung erfordert die Separation beider Proteine zu einem frühen Zeitpunkt.
 Am Ende der Expression wird das Medium mittels analytischer RP- HPLC
 analysiert. Beide Proteine Hirudin und Miniproinsulin werden bei einem pH von 2,5 –
 3 im Gegensatz zu den meisten übrigen Polypeptiden, die sich im Überstand - sei
 es durch spontane Lyse von Hefezellen oder Sekretion - finden, nicht ausgefällt.
 25 Das Kulturmedium wird daher entsprechend angesäuert und anschließen nach
 Abschluß der Fällung , wird der Niederschlag und die Zellen abzentrifugiert. Nach
 Zentrifugation wird das Medium auf pH 3,5 –7 eingestellt und die beiden
 Komponenten Hirudin und Miniproinsulin mittels hydrophober
 Interaktionschromatographie z.B. unter Verwendung einer mit Diaion HP20®
 30 Material gefüllten Chromatographiesäule voneinander getrennt. Aus den Hirudin
 bzw. Miniproinsulin haltigen Fraktionen kann dann Hirudin gemäß EP-A 0 549 915
 bzw. Insulin gemäß EP-A 0 347 781 isoliert werden.

Beispiel 8: Herstellung von Insulin aus Miniproinsulin

- 5 Am Ende des Expressionsabschnittes wird das Kulturmedium auf pH 6,8 eingestellt und anschließend Trypsin eingerührt, so daß eine Endkonzentration von 4 – 8 mg pro Liter eingestellt wird. Nach Inkubation über ca. 4 Stunden wird die so behandelte Fermentationsbrühe auf pH 2,5 – 3 eingestellt. Nach 1- 6 Stunden der Fällung wird das Präzipitat abgetrennt. Das entstandene Mono – Arg – Insulin wird anschließend
- 10 über Ionentauscherchromatographie beispielhaft an S – Sepharose® in einem Puffer aus 50 mM Milchsäure und 30% Isopropanol (pH 3,5) isoliert. Die Elution erfolgt mittels eines NaCl – Gradienten von 0,05 – 0,5 M Salz. Die produkthaltigen Fraktionen werden 1:1 mit H₂O und anschließend mit ZnCl₂ versetzt, so daß eine 0,1% - ige ZnCl₂ Lösung entsteht. Bei pH 6,8 fällt Mono – Arg – Insulin aus. Dies
- 15 wird beispielhaft entsprechend EP-A 0 324 712 zu Insulin umgewandelt.

Beispiel 9: Herstellung von Insulin aus Miniproinsulin nach Filtration

- 20 Am Ende des Expressionsabschnittes werden Zellen und Überstandskomponenten nach Fällung bei pH 2,5 bis 3 abgetrennt. Anschließend erfolgt die Konzentration des Mediums über eine Filtration über Membranen mit einer Ausschlußgrenze von 10 kD. Miniproinsulin wird wie auch das Hirudinderivat quantitativ im Retentat gefunden und kann dann entsprechend Beispiel 8 zu Insulin prozessiert werden.

Patentansprüche:

1. Expressionskassette der Form :

5 $P_x-S_x-B_n-(Z_R)\text{-Transportpeptid}-(Z_1Z_2)\text{-Protein}(Y)\text{-(}Z_1Z_2\text{)-Protein}(Y_m)\text{-T}$;

wobei die Expressionskassette dadurch gekennzeichnet ist , daß sie für ein Transportpeptid kodiert, das über eine Sequenz Z_1Z_2 mit einem zweiten Protein verbunden ist, das wiederum über Z_1Z_2 mit einem Protein Y_1 , das entweder Y
10 entspricht oder von Y verschieden sein kann verbunden ist und das Transportpeptid die Sekretionsrate von Y bzw. Y_m verbessert, wobei

P_x einer beliebigen Promotor – DNA - Sequenz, die so ausgewählt wird, das optimale Ausbeuten an Wertprotein erzielbar werden;

15 S_x einer beliebigen DNA, die entsprechend eine beliebige Signal bzw. Leadersequenz, die optimale Ausbeuten erlaubt, kodiert;

B_n 1-15 genetisch kodierbaren Aminosäuren oder einer chemischen Bindung;

Z dem Codon einer Aminosäure ausgewählt aus Lys bzw. Arg;

Z_1 dem Codon einer Aminosäure ausgewählt aus Lys bzw. Arg;

20 Z_2 dem Codon einer Aminosäure ausgewählt aus Lys bzw. Arg;

Y_m einer DNA – Sequenz, die ein beliebiges in Hefe hestellbares und sekretierbares Protein kodiert ($m= 1- 5$) bzw. einer chemischen Bindung ($m=0$);

R einem Codon für Arginin;

Transportpeptid einer DNA – Sequenz , die ein effizient transportierbares und
25 membrangängiges Peptid kodiert;

Protein Y einer DNA – Sequenz , die ein beliebiges in Hefe herstellbares und sekretierbares Protein kodiert und dessen biologische Aktivität dann, wenn Y_m von einer chemischen Bindung verschieden ist, durch die Verlängerung um ein di – basisches Peptid nicht beeinträchtigt wird bzw. den Abbau der Verängerung durch
30 Carboxypeptidasen erlaubt;

T entspricht einer nicht translatierten DNA – Sequenz, die sich vorteilhaft auf die Expression auswirkt;

entspricht.

2. Expressions kassette gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Transportprotein Hirudin oder einem Derivat des Hirudins entspricht..

Zusammenfassung

- 5 Verwendung supersekretierbarer Peptide in Verfahren zur deren Herstellung und paralleler Verbesserung der Exportrate eines oder mehrere anderer Polypeptide von Interesse

Die Erfindung bezieht sich auf eine Expressionskassette der Form

- 10 $P_x-S_x-B_n-(Z_R)\text{-Transportpeptid}-(Z_1Z_2)\text{-Protein}(Y)\text{-(}Z_1Z_2\text{)-Protein}(Y_m)\text{-T}$; wobei die Expressionskassette dadurch gekennzeichnet ist, daß sie für ein Transportpeptid kodiert, das über eine Sequenz Z_1Z_2 mit einem zweiten Protein verbunden ist, das wiederum über Z_1Z_2 mit einem Protein Y_1 , das entweder Y entspricht oder von Y verschieden sein kann verbunden ist und das Transportpeptid die Sekretionsrate
- 15 von Y bzw. Y_m verbessert, wobei P_x einer beliebigen Promotor – DNA – Sequenz, die so ausgewählt wird, das optimale Ausbeuten an Wertprotein erzielbar werden; S_x einer beliebigen DNA, die entsprechend eine beliebige Signal bzw. Leadersequenz, die optimale Ausbeuten erlaubt, kodiert; B_n 1-15 genetisch kodierbaren Aminosäuren oder einer chemischen Bindung; Z dem Codon einer
- 20 Aminosäure ausgewählt aus Lys bzw. Arg; Z_1 dem Codon einer Aminosäure ausgewählt aus Lys bzw. Arg; Z_2 dem Codon einer Aminosäure ausgewählt aus Lys bzw. Arg; Y_m einer DNA – Sequenz, die ein beliebiges in Hefe hestellbares und sekretierbares Protein kodiert ($m=1-5$) bzw. einer chemischen Bindung ($m=0$);
- 25 R einem Codon für Arginin; Transportpeptid einer DNA – Sequenz, die ein effizient transportierbares und membrangängiges Peptid kodiert; Protein Y einer DNA – Sequenz, die ein beliebiges in Hefe herstellbares und sekretierbares Protein kodiert und dessen biologische Aktivität dann, wenn Y_m von einer chemischen Bindung verschieden ist, durch die Verlängerung um ein di – basisches Peptid nicht beeinträchtigt wird bzw. den Abbau der Veränderung durch Carboxypeptidasen
- 30 erlaubt; T entspricht einer nicht translatierten DNA – Sequenz, die sich vorteilhaft auf die Expression auswirkt. entspricht, sowie Verfahren zu deren Herstellung und Verwendung.